

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
9. September 2005 (09.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/082942 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C08B 31/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/050877

(22) Internationales Anmeldedatum:  
1. März 2005 (01.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
04100813.7 1. März 2004 (01.03.2004) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **B. BRAUN MELSUNGEN AG** [DE/DE]; Carl-Braun-Strasse 1, 34212 Melsungen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BOLL, Michael** [DE/DE]; Dessauer Strasse 15, 34212 Melsungen (DE). **FISCH, Andreas** [—/CH]; Avenue de Chanel 16, CH-1110 Morges (CH). **SPAHN, Donat R.** [—/CH]; Ch. de Champagne 14, CH-1025 St. Sulpice (CH).

(74) Anwälte: **WEBER, Thomas** usw.; von Kreisler Selting Werner, Deichmannhaus am Dom, Bahnhofsvorplatz 1, 50667 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: HYDROXYETHYL STARCH

(54) Bezeichnung: HYDROXYETHYLSTÄRKE

(57) **Abstract:** The invention relates to a hydroxyethyl starch, to a method for the production thereof, a pharmaceutical preparation containing said type of hydroxyethyl starch, and to the use of said pharmaceutical preparation for the production of a volume substitute, a plasma volume substitute or a plasma volume expander, and also to the use of the pharmaceutical preparation for maintaining normovolemia and/or to improve macro and microcirculation and/or to improve nutritive oxygen supply and/or to stabilise haemodynamic effects and/or to improve volume activity and/or to reduce plasma viscosity and/or to increase tolerance to anaemia and/or to haemodilution, in particular, for therapeutic haemodilution in case of disturbances in blood circulation and occlusive arterial diseases, especially peripheral arteries.

(57) **Zusammenfassung:** Es wird eine Hydroxyethylstärke, ein Verfahren zu ihrer Herstellung, eine pharmazeutische Zubereitung enthaltend eine solche Hydroxyethylstärke sowie die Verwendung der pharmazeutischen Zubereitung zur Herstellung eines Volumenersatzmittels, eines Plasmavolumenersatzmittels oder eines Plasmavolumenexpanders, als auch die Verwendung der pharmazeutischen Zubereitung zur Aufrechterhaltung der Normovolämie und/oder zur Verbesserung der Makro- und Mikrozirkulation und/oder zur Verbesserung der nutritiven Sauerstoffversorgung und/oder zur Stabilisierung der Hämodynamik und/oder zur Verbesserung der Volumenwirksamkeit und/oder zur Verringerung der Plasmaviskosität und/oder zur Erhöhung der Anämietoleranz und/oder zur Hämodilution, insbesondere zur therapeutischen Hämodilution bei Durchblutungsstörungen und arteriellen, speziell peripheren arteriellen, Verschlusskrankheiten beschrieben.

WO 2005/082942 A2

Hydroxyethylstärke

Die Erfindung betrifft eine Hydroxyethylstärke sowie ein Verfahren zur Herstellung einer solchen Hydroxyethylstärke. Weiterhin betrifft die Erfindung eine pharmazeuti-  
5 sche Zubereitung enthaltend eine Hydroxyethylstärke sowie die Verwendung einer solchen pharmazeutischen Zubereitung zur Herstellung eines Volumenersatzmittels, eines Plasmaersatzmittels oder eines Plasmaexpanders als auch die Verwendung der pharmazeutischen Zubereitung zur Aufrechterhaltung der Normovolämie und/oder zur Verbesserung der Makro- und Mikrozirkulation und/oder zur Verbesse-  
10 rung der nutritiven Sauerstoffversorgung und/oder zur Stabilisierung der Hämodynamik und/oder zur Verbesserung der Volumenwirksamkeit und/oder zur Verringerung der Plasmaviskosität und/oder zur Erhöhung der Anämietoleranz und/oder zur Hämodilution, insbesondere zur therapeutischen Hämodilution bei Durchblutungsstörungen und arteriellen, speziell peripheren arteriellen, Verschlusskrankheiten.

15

Der Ersatz intravasaler Flüssigkeit gehört zu den wichtigsten Maßnahmen bei der Prophylaxe und Therapie der Hypovolämie und zwar unabhängig davon, ob die Hypovolämie aus dem unmittelbaren Verlust von Blut bzw. Körperflüssigkeiten resultiert (bei akuten Blutungen, Traumen, Operationen, Verbrennungen), aus Verteilungsstö-  
20 rungen zwischen Makro- und Mikrozirkulation (wie bei Sepsis) oder aus einer Vasodilation (z. B. bei der Anästhesieeinleitung). Für diese Indikationen geeignete Infusionslösungen sollen die Normovolämie wieder herstellen und die Perfusion lebenswichtiger Organe sowie den peripheren Blutfluss aufrechterhalten. Gleichzeitig dürfen die Lösungen den Kreislauf nicht übermäßig belasten und sie müssen von Nebenwirkungen möglichst frei sein. In dieser Hinsicht bieten sämtliche derzeit verfügbaren Volumenersatzlösungen Vor- und Nachteile. Sogenannte kristalloide Lösungen (Elektrolytlösungen) sind zwar weitgehend frei von unmittelbaren Nebenwirkungen, gewährleisten aber nur kurzfristige oder inadäquate Stabilisierung des intravasalen Volumens und der Hämodynamik. Bei ausgeprägter oder länger anhaltender Hypo-  
25 volämie müssen sie in exzessiven Mengen infundiert werden, da sie nicht ausschließlich im intravasalen Kompartiment verbleiben, sondern sich rasch im extrava-  
30

- 2 -

salen Raum verteilen. Ein schneller Abstrom in den extravasalen Raum limitiert aber nicht nur die kreislauffüllende Wirkung kristalloider Lösungen, sondern birgt auch das Risiko peripherer und pulmonaler Ödeme. Abgesehen von der vitalen Bedrohung, die ein Lungenödem darstellen kann, führt es außerdem zur Verschlechterung der nutritiven Sauerstoffversorgung, die durch periphere Ödeme ebenfalls beeinträchtigt wird.

Demgegenüber sind kolloidale Volumenersatzlösungen, seien die in ihnen enthaltenen Kolloide natürlichen oder synthetischen Ursprungs, in ihrer Wirkung weitaus zuverlässiger. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sie aufgrund ihrer kolloidosmotischen Wirkung die zugeführte Flüssigkeit länger im Kreislauf zurückhalten als Kristalloide und sie so vor dem Abstrom in das Interstitium schützen. Andererseits geben kolloidale Volumenersatzlösungen in höherem Maß als kristalloide Lösungen zu unerwünschten Reaktionen Anlass. So birgt das natürliche Kolloid Albumin, wie alle Blut- bzw. Plasmaderivate, das Risiko der Ansteckung mit viralen Erkrankungen; zusätzlich kann es zu Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln, z. B. ACE-Inhibitoren, kommen; schließlich ist die Verfügbarkeit von Albumin limitiert und seine Verwendung als Volumenersatzmittel unverhältnismäßig teuer. Weitere Bedenken gegen den Einsatz von Albumin als Volumenersatzmittel haben ihren Grund in der Hemmung der endogenen Synthese von Albumin bei dessen exogener Zufuhr und in seiner leichten Extravasation. Hierunter wird der Übertritt aus dem Kreislauf in den extravasalen Raum verstanden, wo es wegen des kolloidosmotischen Effekts von Albumin zu unerwünschten und langanhaltenden Flüssigkeitsansammlungen kommen kann.

Bei den synthetischen Kolloiden haben schwere anaphylaktoide Reaktionen und eine massive Beeinträchtigung der Blutgerinnung dazu geführt, dass Dextran-Präparate aus der Therapie nahezu völlig verschwunden sind. Hydroxyethylstärke (HES)-Lösungen besitzen zwar ebenfalls das Potential zur Auslösung anaphylaktoider Reaktionen und zur Beeinflussung der Blutgerinnung, dies jedoch in geringerem Maß als Dextran. Schwerwiegende anaphylaktoide Reaktionen (Reaktionen der Schweregrade III und IV) werden mit HES-Lösungen – anders als mit Dextran – äußerst selten beobachtet; und der Einfluss auf die Blutgerinnung, der den hochmolekularen

- 3 -

HES-Lösungen eigen ist, konnte durch die Weiterentwicklung von HES-Lösungen in den letzten Jahren erheblich vermindert werden. Im Vergleich mit den Gelatinelösungen, die ebenfalls als Plasmaersatzmittel Verwendung finden und die Blutgerinnung weitgehend unbeeinflusst lassen, besitzen HES-Lösungen, zumindest deren hoch- und mittelmolekulare Ausführungsformen, den Vorzug längerer Plasmaverweildauer und Wirksamkeit.

EP-A-0402724 offenbart die Herstellung und Verwendung einer Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht  $M_w$  von 60000 bis 600000, einem molaren Substitutionsgrad MS von 0,15 bis 0,5 und einem Substitutionsgrad DS von 0,15 bis 0,5. Die Offenbarung beschäftigt sich mit der schnellen (6 bis 12 Stunden) und vollständigen Abbaubarkeit der als Plasmaexpander einzusetzenden Hydroxyethylstärken. Explizit untersucht wurde dabei innerhalb des bevorzugten mittleren Molekulargewichtsbereichs von 100000 bis 300000 eine Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht von 234000.

US-A-5,502,043 offenbart die Verwendung von Hydroxyethylstärken mit einem mittleren Molekulargewicht  $M_w$  von 110000 bis 150000, einer molaren Substitution MS von 0,38 bis 0,5 und einem Substitutionsgrad DS von 0,32 bis 0,45 zur Verbesserung der Mikrozirkulation bei peripherer arterieller Durchblutungsstörung. Darüber hinaus lehrt die Druckschrift den Einsatz von niedermolekularen ( $M_w$  110000 bis 150000) Hydroxyethylstärken, die bedingt durch ihr niedriges Molekulargewicht die Plasmaviskosität niedrig halten und somit eine Verbesserung der Mikrozirkulation im Blutkreislauf gewährleisten. Abgeraten wird in dieser Schrift jedoch von dem Einsatz höhermolekularer Hydroxyethylstärken, wie etwa einer Hydroxyethylstärke mit einem  $M_w$ : 500000, da diese trotz niedriger molarer Substitution ( $MS=0,28$ ) die Plasmaviskosität erhöhen und somit die Mikrozirkulation verschlechtern.

Weltweit werden zur Zeit unterschiedliche HES-Präparate als kolloidale Volumenersatzmittel verwendet, die sich hauptsächlich in ihrem Molekulargewicht und daneben in dem Ausmaß der Veretherung mit Hydroxyethylgruppen und in anderen Parametern



tern unterscheiden. Die bekanntesten Vertreter dieser Substanzklasse sind die sog. Hetastarch (HES 450/0,7) und Pentastarch (HES 200/0,5). Bei letztgenannter handelt es sich um die derzeit am weitesten verbreitete "Standard-HES". Neben dieser spielen HES 200/0,62 und HES 70/0,5 eine geringere Rolle. Bei den deklarierten Angaben zum Molekulargewicht handelt es sich ebenso wie bei denjenigen zu den anderen Parametern um gemittelte Größen, wobei der Molekulargewichtsdeklaration das Massenmittel ( $M_w$ ) zugrunde liegt, das in Dalton (z. B. bei HES 200000) oder meist verkürzt in Kilodalton (z. B. wie bei HES 200) angegeben wird. Das Ausmaß der Veretherung mit Hydroxyethylgruppen wird durch die molare Substitution MS (z.B. als 0,5 wie in HES 200/0,5; MS = durchschnittliches molares Verhältnis von Hydroxyethylgruppen zu Anhydroglucoseeinheiten) oder durch den Substitutionsgrad (DS = Verhältnis von ein- oder mehrfach hydroxyethylierten Glucosen zu den Gesamt-Anhydroglucoseeinheiten) gekennzeichnet. Entsprechend ihrem Molekulargewicht werden die in klinischem Gebrauch befindlichen HES-Lösungen in hochmolekulare (450 kD), mittelmolekulare (200 - 250 kD) und niedermolekulare Präparate (70 - 130 kD) eingeteilt.

Was die Gerinnungseffekte von HES-Lösungen angeht, so ist zwischen unspezifischen und spezifischen Einflüssen zu unterscheiden. Zu einer unspezifischen Beeinflussung der Blutgerinnung kommt es aufgrund der Verdünnung des Bluts (Hämodilution), die bei der Infusion von HES- und anderen Volumenersatzlösungen in den Blutkreislauf stattfindet. Von dieser Hämodilution sind auch Gerinnungsfaktoren betroffen, deren Konzentrationen je nach Ausmaß und Dauer der infusionsbedingten Verdünnung des Bluts und der Plasmaproteine absinken. Entsprechend große oder anhaltende Effekte können zu einer labordiagnostisch nachweisbaren, in extremen Fällen zu einer klinisch relevanten Hypokoagulabilität führen.

Daneben kann von der Hydroxyethylstärke eine spezifische Beeinflussung der Blutgerinnung ausgehen, für die mehrere Faktoren verantwortlich gemacht werden. So findet man – unter bestimmten Bedingungen bzw. mit bestimmten HES-Präparaten – einen Abfall der Gerinnungsproteine Faktor VIII (F VIII) und von Willebrand-Faktor

(vWF), der größer ist als die hämodilutionsbedingte Abnahme der Plasmaproteine im allgemeinen. Ob dieser stärkere als zu erwartende Abfall durch eine verminderte Bildung bzw. Freisetzung von F VIII/vWF bedingt ist, etwa durch HES-bedingte Coating-Effekte am Gefäßendothel oder durch andere Mechanismen, ist nicht völlig geklärt.

HES beeinflusst aber nicht nur die Konzentration der genannten Gerinnungsfaktoren, sondern offenbar auch die Funktion der Blutplättchen. Hierfür ist ganz oder teilweise die Bindung von HES an die Oberfläche der Blutplättchen verantwortlich, die den Zutritt von Liganden an den Fibrinogenrezeptor der Plättchen hemmt.

Diese spezifischen Wirkungen von HES auf die Blutgerinnung sind bei der Anwendung hochmolekularer HES (z. B. von HES 450/0,7) besonders ausgeprägt, während sie bei mittelmolekularer (z. B. HES 250/0,5) oder niedermolekularer HES (z. B. HES 130/0,4 oder HES 70/0,5) keine so große Rolle mehr spielen (J. Treib et al., Intensive Care Med. (1999), S. 258 bis 268; O. Langeron et al., Anesth. Analg. (2001), S. 855 bis 862; R.G. Strauss et al., Transfusion (1988), S. 257 – 260; M. Jamnicki et al., Anesthesiology (2000), S. 1231 bis 1237).

Vergleicht man das Risikoprofil hochmolekularer HES mit dem der mittel- und niedermolekularen Präparate, so kann man bei den letztgenannten eine deutliche Reduzierung der Risiken feststellen, und zwar nicht nur im Hinblick auf die Wechselwirkung mit der Blutgerinnung, sondern auch im Hinblick auf bestimmte pharmakokinetische Eigenschaften. So zeigen die hochmolekularen HES-Lösungen eine starke Akkumulation im Kreislauf, während dieser Nachteil bei mittelmolekularer HES nur in abgeschwächter Form und bei niedermolekularen Präparaten praktisch nicht mehr vorhanden ist. Dass mit niedermolekularen HES-Lösungen wie mit HES 130/0,4 keine Kumulation mehr auftritt, ist ein relevanter therapeutischer Fortschritt, weil sich die Plasmakonzentrationen von HES in der klinischen Routine nicht bestimmen lassen und selbst extreme Konzentrationen, zu denen es mit den hochmolekularen Lösungen binnen weniger Tage kommen kann, daher unentdeckt bleiben. Bei diesen ist die

- 6 -

Menge der im Kreislauf kumulierenden "Rest-HES" dem Anwender unbekannt, sie beeinflusst aber gleichwohl die Kinetik und das Verhalten derjenigen HES, die in Unkenntnis der im Kreislauf noch vorhandenen Mengen additiv infundiert wurde. Hochmolekulare HES entsprechend dem Stand der Technik ist in ihrer Wirkung daher nicht berechenbar; sie bleibt länger im Kreislauf als dies aus therapeutischen Gründen in den meisten Fällen erforderlich oder erwünscht wäre und ihr metabolisches Schicksal ist ungeklärt.

Im Unterschied dazu verschwindet niedermolekulare HES innerhalb von etwa 20 bis 24 Stunden nach der Infusion vollständig aus dem Kreislauf. Dadurch werden Überhangeffekte vermieden und es kommt – speziell bei wiederholter Infusion – nicht zur Akkumulation. Das pharmakokinetische Verhalten von niedermolekularer Stärke ist – anders als bei hochmolekularer Stärke – berechenbar und lässt sich daher leicht steuern. Eine zu starke Belastung des Kreislaufs oder der Eliminationsmechanismen tritt nicht auf.

Dieses – für sich genommen - vorteilhafte Verhalten niedermolekularer HES im Vergleich mit hochmolekularen Präparaten wird jedoch mit einer erheblich kürzeren Plasmahalbwertszeit erkaufte. Die Plasmahalbwertszeit von niedermolekularer HES beträgt nur etwa die Hälfte derjenigen von HES 200 oder weniger (J. Waitzinger et al., Clin. Drug Invest. (1998) S. 151 bis 160) und liegt im Bereich der Halbwertszeit von Gelatinepräparaten, die als ausgesprochen kurzwirksam einzustufen sind. Zwar muss eine kurze Halbwertszeit eines Volumenersatzmittels nicht grundsätzlich von Nachteil sein, da sie durch öftere bzw. höher dosierte Verabreichung des betreffenden Volumenersatzmittels kompensiert werden kann. Bei schwerer oder anhaltender Hypovolämie birgt ein Volumenersatzmittel mit kurzer Halbwertszeit und kurzer Wirkdauer jedoch die Gefahr unzureichender Kreislauffüllung (ähnlich wie mit kristalloiden Lösungen) bzw. – bei entsprechend höherer Dosierung zur Kompensation dieses Nachteils – das Risiko interstitieller Flüssigkeitsüberladung.

Vor diesem Hintergrund besteht ein Bedarf an einem Volumenersatzmittel, das sich einerseits durch geringe Kumulationsneigung und geringe Beeinflussung der Blutge-

- 7 -

rinnung auszeichnet (wie niedermolekulare HES), andererseits aber eine längere Halbwertszeit aufweist als die niedermolekularen, den kristalloiden Lösungen nahestehenden HES-Lösungen.

- 5 Auf der Suche nach einer Hydroxyethylstärke mit solchen Eigenschaften wurde jetzt gefunden, dass es sehr wohl Hydroxyethylstärke für HES-Lösungen mit längerer Plasmahalbwertszeit – im Vergleich zu bekannten niedermolekularen HES-Lösungen – gibt und diese auch hergestellt werden können und zwar überraschenderweise ohne dass diese erfindungsgemäßen hochmolekularen Lösungen die Nachteile bisheriger hochmolekularer Lösungen aufweisen, wie z. B. deren Eigenschaft, im Kreislauf zu akkumulieren, oder deren ausgeprägte Hemmung der Blutgerinnung.

Gegenstand der Erfindung in einer Ausführungsform ist daher eine Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht  $M_w$  größer oder gleich 500000, wobei der molare Substitutionsgrad MS zwischen 0,25 und 0,5, vorzugsweise von 0,35 bis 0,50 ist ( $0,35 \leq MS \leq 0,50$ ) und das  $C_2/C_6$ -Verhältnis 2 bis unterhalb 8 beträgt.

Die erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärken werden durch den molaren Substitutionsgrad MS beeinflusst. Der molare Substitutionsgrad MS (molar substitution) ist definiert als die durchschnittliche Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Anhydroglucose-Einheit (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie (1987), S. 271 bis 278). Der molare Substitutionsgrad kann gemäss Ying-Che Lee et al. Anal. Chem. (1983) 55, 334 und K.L. Hodges et al., Anal. Chem (1979) 51, 2171 bestimmt werden. Eine bekannte Menge HES wird dabei unter Zusatz von Adipinsäure und Iodsäure (HI) in Xylol einer Etherspaltung unterzogen. Das freigesetzte Ethyliodid wird anschliessend gaschromatographisch unter Verwenden eines internen Standards (Toluol) und externer Standards (Ethyliodid-Eichlösungen) quantifiziert. Der molare Substitutionsgrad MS beeinflusst die Wirkung der erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärken. Wird der MS-Wert zu hoch gewählt, so kann dies bei Einsatz der Hydroxyethylstärken als Volumenersatzmittel zu einer Kumulationswirkung im Blutkreislauf führen. Wird andererseits der MS-Wert zu niedrig gewählt, so kann dies zu einem zu raschen Abbau



der Hydroxyethylstärke im Kreislauf führen und damit die gewünschte Dauer der Plasmahalbwertszeit vermindern. Als vorteilhaft hat sich ein molarer Substitutionsgrad MS von 0,35 bis 0,5 ( $0,35 \leq MS \leq 0,50$ ), vorzugsweise 0,39 bis kleiner oder gleich 0,45 ( $0,39 \leq MS \leq 0,45$ ) und insbesondere ein MS-Wert von größer 0,4 bis 0,44 ( $0,4 < MS \leq 0,44$ ) herausgestellt.

Die erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärken gehören zu den höhermolekularen Hydroxyethylstärken und weisen vorzugsweise ein mittleres Molekulargewicht ( $M_w$ ) oberhalb von 600000 bis 1500000, besonders bevorzugt zwischen 620000 bis 1200000 und insbesondere zwischen 700000 bis 1000000 auf. Die Hydroxyethylstärken liegen herstellungsbedingt nicht als Molekular-einheitliche Substanz mit definiertem Molekulargewicht vor, sondern als Gemisch von Molekülen unterschiedlicher Größe, die auch verschieden durch Hydroxyethylgruppen substituiert sind. Die Charakterisierung solcher Gemische bedarf daher der Zuhilfenahme statistisch gemittelter Größen. Zur Kennzeichnung des durchschnittlichen Molekulargewichts dient daher das gemittelte Molekulargewicht ( $M_w$ ), wobei die allgemeine Definition dieses Mittelwertes in Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie (1987), S. 271 bis 278 angegeben ist.

Die Molekulargewichtsbestimmung mittels GPC-MALLS unter Verwendung der GPC-Säulen TSKgel G 6000 PW, G 5000 PW, G 3000 PW und G 2000 PW (7,5 mm x 30 cm), des MALLS-Detektors (DAWN-EOS; Wyatt Deutschland GmbH, Woldert) und des RI-Detektors (Optilab DSP; Wyatt Deutschland GmbH, Woldert) bei einer Flussrate von 1,0 ml/Minute in einem 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 erfolgen. Die Auswertung kann mittels ASTRA-Software (Wyatt Deutschland GmbH, Woldert) durchgeführt werden.

Bevorzugt sind solche Hydroxyethylstärken, die aus nativen oder partiell hydrolysierten Getreide- oder Kartoffelstärken erhältlich sind. Besonders vorteilhaft ist dabei aufgrund ihres hohen Gehalts an Amylopektin die Verwendung der Stärken aus Wachsvarietäten der entsprechenden Pflanzen, sofern diese existieren (z.B. Wachsmais, Wachsreis).

Die erfindungsgemäße Hydroxyethylstärke ist ferner durch das Verhältnis der Substitution an C<sub>2</sub> zur Substitution an C<sub>6</sub> der Anhydroglucose-Einheiten beschrieben. Dieses Verhältnis, das im Rahmen dieser Erfindung auch als C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnis abgekürzt wird, bedeutet das Verhältnis der Zahl der in 2-Stellung substituierten Anhydroglucose-Einheiten zu der Zahl der in 6-Stellung substituierten Anhydroglucose-Einheiten der Hydroxyethylstärke. Das C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnis einer HES kann durch die Menge der bei der Hydroxyethylierung verwendeten Natronlauge in weiten Grenzen variiert werden, wie in Tabelle 1 und 2 dargestellt ist. Je höher die eingesetzte Menge an NaOH ist, umso stärker werden die Hydroxygruppen in 6-Stellung bei der Anhydroglucose der Stärke für die Hydroxyethylierung aktiviert. Daher nimmt das C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnis mit steigender NaOH-Konzentration während der Hydroxyethylierung ab. Die Bestimmung erfolgt wie von Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie (1987), S. 271 bis 278, angegeben. Die C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnisse betragen in der nachfolgenden Reihenfolge bevorzugt 3 bis unterhalb 8, 2 bis 7, 3 bis 7, 2,5 bis kleiner oder gleich 7, 2,5 bis 6 oder 4 bis 6. Das C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnis stellt bei den höhermolekularen HES gemäß der Erfindung einen weiteren Beitrag zur Lösung der der Erfindung zugrundeliegenden Aufgaben dar.

Die erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärken sind aufgrund ihrer hervorragenden Verträglichkeit und ihrer guten Abbaubarkeit im menschlichen oder tierischen Organismus geeignet in den unterschiedlichsten pharmazeutischen Zubereitungen eingesetzt zu werden.

In einer besonderen Ausgestaltungsform weisen die erfindungsgemäßen HES ein mittleres Molekulargewicht von 700000 bis 1000000, einen molaren Substitutionsgrad MS von größer 0,4 bis 0,44 ( $0,4 < MS \leq 0,44$ ) und ein C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnis von 2 bis 7, vorzugsweise 3 bis 7 und insbesondere von 2,5 bis 6 auf.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Hydroxyethylstärke, vorzugsweise einer erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärke. Vorzugsweise umfasst das Verfahren die folgenden Schritte:

- (i) Umsetzung von in Wasser suspendierter Stärke, vorzugsweise Maisstärke, besonders bevorzugt partiell hydrolysierte, sog. dünnkochende Wachsmaisstärke, mit Ethylenoxid und

- 10 -

- (ii) Teilhydrolysierung des erhaltenen Stärkederivats mit Säure, vorzugsweise Salzsäure, bis zum gewünschten mittleren Molekulargewichtsbereich der Hydroxyethylstärke.

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärken eignen sich prinzipiell alle bekannten Stärken, vor allem native oder partiell hydrolysierte Stärken, vorzugsweise Getreide- oder Kartoffelstärken, insbesondere solche mit einem hohen Gehalt an Amylopektin. In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Stärken aus Wachs-Varietäten, insbesondere Wachsmais und/oder Wachsreis, eingesetzt. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Herstellung der HES durch Umsetzung von in Wasser suspendierter Getreide- und/oder Kartoffelstärke, vorzugsweise dünnkochender Wachsmaisstärke mit Ethylenoxid. Vorteilhaft wird die Reaktion durch Zugabe von Alkalisierungsmitteln, vorzugsweise Alkalimetallhydroxiden, beispielsweise Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid katalysiert. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der in Wasser suspendierten Stärke daher zusätzlich Alkalisierungsmittel, vorzugsweise NaOH, zugesetzt. Der suspendierten Stärke wird das Alkalisierungsmittel vorteilhafterweise in einer Menge zugesetzt, so dass das molare Verhältnis von Alkalisierungsmittel zu Stärke größer als 0,2, vorzugsweise 0,25 bis 1, insbesondere 0,3 bis 0,8 ist. Durch das Verhältnis von Ethylenoxid zu Stärke während des Hydroxyethylierungsschrittes kann dabei der molare Substitutionsgrad, d.h. das molare Verhältnis von Hydroxyethylgruppen zu Anhydroglucoseeinheiten über den gewünschten MS-Bereich beliebig gesteuert werden. Bevorzugt erfolgt die Umsetzung zwischen Ethylenoxid und suspendierter Stärke in einem Temperaturbereich zwischen 30 und 70, vorzugsweise zwischen 35 und 45 °C. Üblicherweise erfolgt nach der Umsetzung die Entfernung gegebenenfalls vorhandener Restmengen des Ethylenoxids. Im Anschluss an die Umsetzung erfolgt in einem zweiten Schritt eine saure Teilhydrolyse der derivatisierten Stärke. Unter Teilhydrolyse ist dabei die Hydrolyse der alpha-glykosidisch miteinander verknüpften Glucosebausteine der Stärke zu verstehen. Prinzipiell lassen sich für die saure Hydrolyse alle dem Fachmann geläufigen Säuren einsetzen, bevorzugt sind jedoch Mineralsäuren, insbesondere Salz-

säure. Die Hydrolyse kann auch enzymatisch erfolgen, wobei handelsübliche Amylasen Verwendung finden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zusätzlich die Schritte (iii) der Sterilfiltration und gegebenenfalls (iv) der Ultrafiltration. Werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren die vorbeschriebenen Filtra-  
5 tionen durchgeführt, so wird die saure Teilhydrolyse der Roh-HES bis zu einem mittleren Molekulargewicht vorgenommen, das sich etwas unterhalb des gewünschten Zielmolekulargewichts befindet. Durch die Ultrafiltration können niedermolekulare Reaktionsnebenprodukte, vor allem Ethylenglykol, entfernt werden, wobei das mittlere Molekulargewicht aufgrund der Eliminierung eines Teils der niedermolekularen  
10 HES-Fraktion leicht ansteigt.

Vorzugsweise werden die aus dem Herstellverfahren hervorgehenden Lösungen anschließend auf die gewünschte HES-Konzentration verdünnt, durch Salzzusatz auf den gewünschten osmotischen Druck eingestellt, steril filtriert und in geeignete Be-  
15 hältnisse abgefüllt. Gegebenenfalls kann eine Sterilisation, bevorzugt durch gespannten Wasserdampf erfolgen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine pharmazeutische Zubereitung enthaltend eine oder mehrere erfindungsgemäße Hydroxyethylstärke(n). Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zubereitung kann prinzipiell in jeder erdenk-  
20 lichen galenischen Darbietungsform bereitgestellt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen intravenös injiziert oder infundiert werden. Bevorzugt liegen die pharmazeutischen Zubereitungen daher als wässrige Lösung oder als kolloidale wässrige Lösung vor. Vorzugsweise enthalten die Zubereitungen die erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärken in einer Konzentration von bis zu 20, weiter be-  
25 vorzugt von 0,5 bis 15, besonders bevorzugt von 2 bis 12, insbesondere von 4 bis 10, beispielsweise 6 %.

Die Mengenangaben erfolgen, wenn nicht anders angegeben in %, das im Rahmen der vorliegenden Erfindung gleichzusetzen ist mit g/100 ml Lösung.



In einer weiteren Ausführungsform enthalten die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen zusätzlich Natriumchlorid, vorzugsweise 0,6 bis 2 %, besonders bevorzugt 0,9 %. Eine 0,9 prozentige Lösung von Natriumchlorid in Wasser wird auch als physiologische Kochsalzlösung bezeichnet. Sie weist den gleichen osmotischen Druck wie das Blutserum auf und ist daher als isotonische Lösung zur intravenösen Injektion oder Infusion geeignet. Zur Isotonisierung können auch alle anderen osmotisch wirksamen Substanzen verwendet werden, soweit sie physiologisch unbedenklich und gut verträglich sind wie z. B. Glucose, Glucoseersatzstoffe (Fructose, Sorbit, Xylit) oder Glycerin. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können die pharmazeutischen Zubereitungen zusätzlich weitere plasmaadaptierte Elektrolyte enthalten. Die Herstellung solcher isotoner Zubereitungen ist dem Fachmann bekannt. Ein Beispiel für eine isotone Lösung mit plasmaadaptierten Elektrolyten ist die sogenannte Tyrode-Lösung. Sie enthält 0,8 g NaCl, 0,02 g KCl, 0,02 g  $\text{CaCl}_2$ , 0,01 g  $\text{MgCl}_2$ , 0,005 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g  $\text{NaHCO}_3$  und 0,1 g Glucose in 100 ml destilliertem Wasser. Ein weiteres Beispiel ist die sogenannte Ringer-Lösung, die 0,8 % Natriumchlorid, 0,02 % Kaliumchlorid, 0,02 % Calciumchlorid und 0,1 % Natriumhydrogencarbonat aufweist. Hierbei können selbstverständlich auch die Anionen der Elektrolyte durch metabolisierbare Anionen ausgetauscht werden, so kann beispielsweise in der Ringer-Lösung das Natriumhydrogencarbonat durch 0,3 oder 0,6 % Natriumlactat ersetzt werden. Eine entsprechende Elektrolytzusammensetzung bzw. -lösung ist dem Fachmann als "Ringer-Lactat" bekannt. Weitere metabolisierbare Anionen, die allein oder in Kombination Verwendung finden können, sind Acetat (z.B. "Ringer-Acetat") oder Malat.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die pharmazeutischen Zubereitungen auch als hypertone Lösungen vorliegen. Hypertone Lösungen sind solche mit einem höheren osmotischen Druck als das menschliche Blut. Die Applikation hypertoner pharmazeutischer Zubereitungen kann bei bestimmten Krankheitsbildern vorteilhaft sein. Der erforderliche hohe osmotische Druck hypertoner Lösungen wird durch Zugabe entsprechender Mengen osmotisch wirksamer Substanzen eingestellt, z.B. durch Natriumchlorid, das zu diesem Zweck in Konzentrationen bis 7,5 % und mehr verwendet werden kann.

Zur Vermeidung und Reduzierung der Gefahr von Infektionen werden die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen vorzugsweise sterilfiltriert oder hitzesterilisiert. Zwecks Sterilfiltration erfindungsgemäßer wässriger oder kolloidaler wässriger pharmazeutischer Zubereitungen eignen sich insbesondere feinporige Filterkartuschen, wie sie beispielsweise unter dem Markennamen SARTPORE von der Firma Sartorius zur Verfügung gestellt werden. Geeignet sind beispielsweise solche Filterkartuschen mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm. Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen können darüber hinaus hitzesterilisiert werden, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung der Hydroxyethylstärken kommt. Vorzugsweise wird die Hitzesterilisation bei einer Temperatur oberhalb von 100 °C, besonders bevorzugt zwischen 105 und 150 °C, insbesondere zwischen 110 und 130 °C, beispielsweise 121 °C über einen Zeitraum von bis zu 30 Minuten, vorzugsweise bis zu 25 Minuten, insbesondere zwischen 18 und 22 Minuten durchgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die pharmazeutische Zubereitung ein Volumenersatzmittel. Volumenersatzmittel finden ihren Einsatz beim Ersatz intravasaler Flüssigkeit in tierischen und menschlichen Organismen. Volumenersatzmittel finden insbesondere bei der Prophylaxe und Therapie der Hypovolämie ihren Einsatz. Es ist dabei unbedeutend, ob die Hypovolämie aus dem unmittelbaren Verlust von Blut bzw. Körperflüssigkeiten resultiert, wie beispielsweise bei akuten Blutungen, Traumen, Operationen, Verbrennungen, usw. oder aus Verteilungsstörungen zwischen Makro- und Mikrozirkulation, wie beispielsweise bei der Sepsis oder aus einer Vasodilatation, wie beispielsweise bei der Einleitung der Anästhesie. Die Volumenersatzmittel werden dabei weiter unterteilt in die sogenannten Plasmaersatzmittel und die sogenannten Plasmaexpander. Bei den Plasmaersatzmitteln entspricht das intravasal applizierte Volumen des Mittels auch dem Volumen, das den Gefäßen zugeführt wird. Bei den Plasmaexpandern hingegen ist das intravasal applizierte Flüssigkeitsvolumen des Expanders geringer als das den Gefäßen real zugeführte Volumen. Dieses Phänomen liegt darin begründet, dass durch den Einsatz von Plasmaexpandern das onkotische Gleichgewicht zwischen Intra- und Extravasalraum gestört wird und zusätzliches Flüssigkeitsvolumen in das zu behandelnde Gefäßsystem aus dem extravasalen Raum einströmt.

Plasmaexpander unterscheiden sich von den Plasmaersatzmitteln im Wesentlichen dadurch, dass die Konzentration der enthaltenen erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärken erhöht ist und/oder die Konzentration der jeweiligen Elektrolyte ein onkotisches und/oder osmotisches Ungleichgewicht hervorrufen.

- 5 Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zubereitung kann ferner einen pharmazeutischen Wirkstoff oder Wirkstoffkombinationen enthalten und so als Medium zur Verabreichung der darin gelösten Wirkstoffe, insbesondere durch Injektion und Infusion dienen.

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitung zur Herstellung eines Volumenersatzmittels oder eines Plasmaersatzmittels oder eines Plasmaexpanders.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen können besonders bevorzugt als Volumenersatzmittel oder Plasmaersatzmittel oder Plasmaexpander verwendet werden. Bevorzugt dienen die pharmazeutischen Zubereitungen der Aufrechterhaltung der Normovolämie. Die Aufrechterhaltung der Normovolämie ist von besonderer Bedeutung für die hämodynamische Stabilität, die einen entscheidenden Einfluss auf den menschlichen oder tierischen Organismus, beispielsweise bezüglich des Blutdrucks, der Diureserate oder der Herzfrequenz hat. Um die Aufrechterhaltung der Normovolämie möglichst schnell nach einem intravasalen Flüssigkeitsverlust zu kompensieren, haben sich die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen als besonders vorteilhaft erwiesen, da sie im Vergleich zu den im Stand der Technik bekannten Plasmaersatzmitteln, speziell niedermolekularen HES-Lösungen, wie z.B. HES 130/0,4, eine verlängerte Plasmahalbwertszeit aufweisen, insbesondere in der entscheidenden Phase unmittelbar nach der Infusion. Vorteilhaft sind die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen insbesondere auch deshalb, da überraschenderweise gefunden wurde, dass bei Verwendung der Zusammensetzungen die Blut- und/oder Plasnaviskosität im Unterschied zu der in US 5,502,043 für hochmolekulare HES getroffenen Aussage nicht ansteigt und da die Blutgerinnung weniger gehemmt wird als mit anderen hochmolekularen Zubereitungen. Dass die Plasnaviskosität überraschenderweise nicht ansteigt, sorgt dabei e-

15  
20  
25  
30

benfalls für eine Verbesserung der Mikrozirkulation sowie zu einer verbesserten nutritiven Sauerstoffversorgung der Gewebe.

Ein weiterer Gegenstand ist die Verwendung der erfindungsgemäßen pharmazeuti-  
5 schen Zubereitung zur Aufrechterhaltung der Normovolämie und/oder zur Verbesserung der Makro- und Mikrozirkulation und/oder zur Verbesserung der nutritiven Sauerstoffversorgung und/oder zur Stabilisierung der Hämodynamik und/oder zur Verbesserung der Volumenwirksamkeit und/oder zur Verringerung der Plasmaviskosität und/oder zur Erhöhung der Anämietoleranz und/oder zur Hämodilution, insbesondere  
10 zur therapeutischen Hämodilution bei Durchblutungsstörungen und arteriellen, speziell peripheren arteriellen, Verschlusskrankheiten.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen oder die erfindungsgemäße Hydroxyethylstärke werden vorzugsweise zur Herstellung von Medikamenten,  
15 insbesondere für Medikamente zur Aufrechterhaltung der Normovolämie und/oder zur Verbesserung der Makro- und Mikrozirkulation und/oder zur Verbesserung der nutritiven Sauerstoffversorgung und/oder zur Stabilisierung der Hämodynamik und/oder zur Verbesserung der Volumenwirksamkeit und/oder zur Verringerung der Plasmaviskosität und/oder zur Erhöhung der Anämietoleranz und/oder zur Hämodilu-  
20 tion, insbesondere zur therapeutischen Hämodilution bei Durchblutungsstörungen und arteriellen, speziell peripheren arteriellen, Verschlusskrankheiten verwendet.

Darüber hinaus werden die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen oder die erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärken vorteilhafterweise in Verfahren zur  
25 Behandlung der Aufrechterhaltung der Normovolämie und/oder Verbesserung der Makro- und Mikrozirkulation und/oder Verbesserung der nutritiven Sauerstoffversorgung und/oder Stabilisierung der Hämodynamik und/oder Verbesserung der Volumenwirksamkeit und/oder Verringerung der Plasmaviskosität und/oder Erhöhung der Anämietoleranz und/oder Hämodilution, insbesondere therapeutischen Hämodilution  
30 bei Durchblutungsstörungen und arteriellen, speziell peripheren arteriellen, Verschlusskrankheiten eingesetzt.



- 16 -

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend in getrennter Form

- (i) eine erfindungsgemäße Hydroxyethylstärke,
- 5 (ii) eine sterile Salz-Lösung, vorzugsweise Natriumchlorid-Lösung, und gegebenenfalls
- (iii) einen pharmazeutischen Wirkstoff oder eine Wirkstoffkombination.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Kit die Einzelkomponenten (i), (ii) und gegebenenfalls (iii) in getrennten Kammern in einem Mehrkammerbeutel auf, wobei sowohl alle Komponenten getrennt, wie auch bestimmte Komponenten, z.B. (i) und (ii), in einer Kammer gemeinsam vorliegen können.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele näher erläutert.

15

### Herstellungsbeispiele für HES-Rohstoffe

Beispiel 1: Herstellung von HES-Rohstoffen mit identischem MS und C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-  
20 Verhältnis, aber unterschiedlichen Molekulargewichten

Die im experimentellen Teil beschriebenen HES-Spezies für die in vivo-Untersuchungen wurden aus einem einzigen Reaktionsansatz durch fraktionierte Hydrolyse hergestellt. Zu diesem Zweck wurde wie folgt verfahren. 30 kg dünnkochende Wachsmaisstärke wurden in 52,2 kg WFI (Wasser für Injektionszwecke) bei  
25 Raumtemperatur unter starkem Rühren suspendiert. Um die Stärke optimal zu hydratieren, wurde die Suspension anschließend durch Erhitzen auf mindestens 85°C verkleistert. Nach mehrmaliger Inertisierung der Suspension mit Stickstoff mittels 10 minütiger Durchleitung von Stickstoff und nachfolgender Evakuierung mittels Vakuum  
30 wurde die Stärke durch Zugabe von 5,1 kg NaOH aktiviert. Anschließend wurde 4,159 kg gekühltes Ethylenoxid in flüssiger Form in den Reaktor geleitet und die

Temperatur langsam auf 40 °C erhöht und die Reaktionsmischung 2 Stunden unter fortgesetztem Rühren bei dieser Temperatur belassen. Nicht umgesetztes Ethylenoxid wurde durch mehrmaliges Inertisieren wie oben beschrieben aus dem Reaktionsansatz entfernt. Aus dieser Roh-HES wurden dann durch schrittweise saure Hydrolyse 3 HES-Präparate mit identischem Mw und C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnis, aber unterschiedlichem Mw hergestellt. Zur Reduktion des Molekulargewichtes wurde die Lösung mit 20 %iger HCl auf pH 2,0 eingestellt, auf 75 ± 1 °C aufgeheizt und solange bei dieser Temperatur belassen, bis das mittlere Molekulargewicht Mw des HES-Kolloids, bestimmt mittels GPC-MALLS, auf 865 kD abgesunken war. Ein Drittel des Hydrolyseansatzes wurde dem Reaktor entnommen und sofort auf eine Temperatur von unter 50 °C abgekühlt. Nach Entfärbung der Lösung durch Aktivkohlebehandlung wurde die Lösung mittels handelsüblicher Vorfilter und Sterilfilter filtriert und nach Verdünnung auf 12 % durch Ultrafiltration (UF) aufgereinigt. Dazu wurden Polyethersulfon-Membranen der Firma Millipore mit einem cut-off von 10 kD verwendet. Im Lauf der UF steigt das Mw aufgrund der teilweisen Elimination der niedermolekularen HES Fraktion etwas an. Dieser Anstieg ist abhängig vom Ausgangs-Mw der Kolloidpräparation, vor allem aber vom deklarierten cut-off der eingesetzten UF-Membran und der eingesetzten UF-Membran-Charge. Um ein gewünschtes Zielmolekulargewicht nach UF zu erzielen, muss der Mw-Shift während der UF vorab mit der vorhandenen UF-Membran-Charge experimentell ermittelt werden. Zu beachten ist ebenfalls, dass vom Zeitpunkt der Probenentnahme zur Bestimmung des Mw während der sauren Hydrolyse bis zum Vorliegen des ermittelten Mw-Wertes die Hydrolyse weiter voranschreitet. Daher ist die Abnahme des Mw über die gesamte Hydrolysedauer systematisch zu erfassen und durch Extrapolation des Mw über die Zeit der Zeitpunkt abzuschätzen, bei dem das Ziel-Mw erreicht sein wird. Zu diesem extrapolierten Zeitpunkt wird die Hydrolyse dann abgebrochen. Der nach Entnahme des ersten Drittels verbliebene Hydrolyseansatz wurde in der Zwischenzeit so lange weitergefahren, bis das mittlere Molekulargewicht Mw auf 460 kD abgesunken war. Anschließend wurde das zweite Drittel genauso aufgearbeitet wie das erste Drittel. Das verbleibende Drittel wurde parallel dazu bis zu einem Mw von 95 kD weiterhydrolysiert und dem gleichen Aufarbeitungsverfahren unterzogen wie die beiden anderen Teilansätze. Aus

- 18 -

Teilansatz 1 war HES 900/0,42 ( $C_2/C_6$ -Verhältnis = 4,83), aus Teilansatz 2 HES 500/0,42 ( $C_2/C_6$ -Verhältnis = 4,83) und aus Teilansatz 3 HES 130/0,42 ( $C_2/C_6$ -Verhältnis = 4,83) zugänglich.

- 5 Nach Beendigung der Ultrafiltration wurde die Kolloidkonzentration auf 6 % und der pH-Wert auf 5,5 eingestellt, die Lösung durch Zusatz von NaCl isotonisiert, in Glasflaschen à 500 ml abgefüllt und 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert.

#### Beispiel 2: Herstellung weiterer HES-Rohstoffe

10

Um HES-Kolloide mit anderen molaren Substitutionsgraden und  $C_2/C_6$ -Verhältnissen zu erzeugen, wurde eine Reihe weiterer Experimente in der gleichen Ansatzgrösse durchgeführt, wobei die Menge an Ethylenoxid entsprechend variiert wurde. Ausserdem wurde die saure Hydrolyse beim Erreichen unterschiedlicher Mw (Ziel-Mw) ab-

15 gestoppt. Diese Experimente sind in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt:

Tabelle 1

	Bsp. 1	Bsp. 2	Bsp. 3	Bsp. 4	Bsp. 5
<b>Reaktionsbedingungen</b>					
Stärke (kg)	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
WFI (kg)	52,0	52,0	52,0	52,0	52,0
NaOH 50 % (kg)	9,5	4,7	4,7	9,5	4,7
Ethylenoxid (kg)	4,0	3,6	4,4	4,5	3,8
Ziel-Mw (nach saurer Hydrolyse) (kDa)	1500	990	885	770	665
<b>HES-Charakteristik</b>					
MS (mol/mol)	0,39	0,40	0,45	0,46	0,42
Mw nach UF (kDa)	1520	1050	915	795	710
$C_2:C_6$ -Verhältnis	2,3	6,0	5,9	2,2	6,1

20

Beispiel 3: Einfluss des molaren Verhältnisses von NaOH zu Stärke während der Hydroxyethylierung auf das C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnis

Um die Steuerbarkeit des C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnisses durch das molare Verhältnis von NaOH zu Anhydroglucoseeinheiten der Stärke aufzuzeigen, wurden 30 kg dünnkochende Wachsmaisstärke mit unterschiedlichen Mengen NaOH versetzt und mit Ethylenoxid bei 40°C umgesetzt. In Tabelle 2 sind die eingesetzten Mengen an Reagenzien und die C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnisse sowie das MS der durch diese Reaktion gewonnenen HES-Produkte aufgeführt. Wie zu erkennen, nimmt das C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnis mit steigendem Verhältnis NaOH vs. Stärke ab. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die basenkatalysierte Hydroxyethylierung der Stärke bei niedriger NaOH-Konzentration bevorzugt an den Hydroxyethylgruppen in 2-Position der Anhydroglucoseeinheiten erfolgt, die am reaktivsten sind. Durch höhere NaOH-Konzentrationen werden auch die per se weniger reaktiven C<sub>6</sub>-Hydroxygruppen genügend stark aktiviert, um effizient hydroxyethyliert zu werden.

Tabelle 2: Steuerung des C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnisses während der Hydroxyethylierung

Versuch	WFI [kg]	Stärke [kg]	NaOH (50 Gew.-%) [kg]	Molares Verhältnis NaOH vs. Stärke	Ethylen- oxid [kg]	MS	C <sub>2</sub> /C <sub>6</sub>
# 1	50	30	1,5	0,1	4,0	0,4	12
# 2	50	30	4,5	0,3	3,8	0,4	7
# 3	50	30	11,1	0,75	4,4	,04	3



### Herstellungsbeispiele für HES-Fertigprodukte

In der nachfolgenden Tabelle 3 sind die Rezepturen für die Herstellung verschiedener HES-Lösungen aufgeführt. Die HES wurde als HES-Konzentrat nach der Ultrafiltration eingesetzt. Die Menge an HES-Konzentrat, die zur Herstellung einer 6%igen bzw. 10%igen HES Lösung benötigt wurde, wurde dabei durch Dreisatzrechnung bestimmt. Eine andere Möglichkeit besteht darin sprühgetrocknete HES zu verwenden, was für den Fachmann, der mit einem Sprühturm ausgerüstet ist, keine Schwierigkeit darstellt. Die verwendete HES hatte ein Molekulargewicht von 900 kD und ein MS von 0,42.

In einen 200 l Ansatztank wurden jeweils die benötigte Menge an HES-Konzentrat und die in der Tabelle angegebenen Mengen der Salze und NaOH-Lösung eingewogen und die Salze unter Rühren gelöst. Nach pH-Einstellung der Lösungen 1, 4, 5, 7 und 8 auf 5,5 und der Lösungen 2, 3, 6 auf 6,0 wurde soviel Wasser für Injektionszwecke (WFI) zugegeben, dass die theoretischen Na-Konzentrationen gemäss Spezifikation erreicht wurden.

Wie es dem Fachmann ohne weiteres ersichtlich ist, können durch Änderung der Einwaage der aufgeführten wirksamen Bestandteile bzw. Hilfsstoffe sowie durch das Weglassen oder Hinzufügen weiterer Substanzen die Rezepturen in weiten Grenzen variiert und bei Verwendung anderer HES-Spezies auch mit diesen entsprechende Lösungen hergestellt werden.

Tabelle 3

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Herstellungszusammensetzungen</b>								
HES [g/l]	60	60	60	60	100	100	100	100
NaCl [g/l]	9,00	6,369	17,37	100,0	9,00	6,369	30,00	60,00
KCl [g/l]	0	0,373	0,373	0	0	0,373	0	0
MgCl <sub>2</sub> [g/l]	0	0,203	0,203	0	0	0,203	0	0
CaCl <sub>2</sub> [g/l]	0	0,294	0,294	0	0	0,294	0	0
Na-Acetat [g/l]	0	5,032	5,032	0	0	5,032	0	0
<b>Analysenergebnisse der Lösungen</b>								
HES [%]	6,0	6,1	6,0	5,9	10,0	10,1	9,9	10,0
Na [mM]	153,9	146,1	334,3	1711	153,7	146,0	512,5	1026
K [mM]	0	5,1	5,0	0	0	5,0	0	0
Mg [mM]	0	1,0	0,9	0	0	1,0	0	0
Ca [mM]	0	2,1	2,0	0	0	2,0	0	0
Cl [mM]	154,8	120,2	308,5	1712	154,8	120,1	513,7	1028
Acetat [mM]	0	37,0	37,0	0	0	37,0	0	0
pH	5,5	6,0	5,9	5,3	5,4	6,1	5,4	5,5

**Messmethoden der Anwendungsbeispiele**

5

Im Folgenden werden die Meßmethoden beschrieben, mit denen die Blut- und Plasmaproben untersucht wurden.

Nativblutmessungen:

10

Mit Citrat versetzte Blutproben wurden im Labor wie folgt behandelt:

Eine Probe wurde sofort für die Blutviskositätsmessung verwendet (Rheostress<sup>®</sup> 1, Thermo-Haake, Karlsruhe, Deutschland) bei linear ansteigenden Scherraten von 1 – 240 pro Sekunde. Die Viskosität wurde bei Scherraten von 1 pro Sekunde und 128

- 22 -

pro Sekunde untersucht. Vor der Thromboelastograph<sup>®</sup> Analyse (TEG<sup>®</sup>, Haemoscope Corporation, Niles, Illinois) wurden die Blutproben für eine Stunde in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Die Blutrekalzifizierung und die TEG<sup>®</sup>-Messungen wurden entsprechend der Herstelleranleitung durchgeführt. Bestimmt wurde der Koagulationsindex (CI), der mehrere Partialfunktionen der Thrombelastographie zusammenfasst.

#### Plasma-Messungen:

Die Blutproben wurden für 15 Minuten bei 4 °C und 3000 U/min. zentrifugiert (Rotana/RP, Hettich, Bäch, Schweiz). Die Plasnaviskosität wurde entsprechend, wie bereits für die Blutbestimmung beschrieben, gemessen.

Die Prothrombin-Zeit (PT) und die aktivierte partielle Thromboplastin-Zeit (aPTT) wurden mittels eines automatischen Koagulations-Analyzers (BCS, Dade Behring, Marburg, Deutschland) mit Hilfe eines PT-Reagenzes, enthaltend einen rekombinanten Gewebefaktor (Innovin<sup>®</sup>, Dade Behring) und einem aPTT-Reagenz, enthaltend Ellagsäure (Actin FS<sup>®</sup>, Dade Behring) bestimmt. PT-Werte wurden in INR-Werte, basierend auf den ISI-Werten, die vom Hersteller geliefert wurden, überführt. Die funktionelle Aktivität des von-Willebrand-Faktors (vWF) wurde bestimmt mittels eines kommerziellen Ristocetin-Cofaktor-Assays (vWF RCA, Dade Behring) in einem automatisierten Koagulations-Analyser (BCS, Dade Behring). Die vWF-Aktivität wurde ermittelt anhand der Fähigkeit menschliche Thrombozyten in Gegenwart von Ristocetin zu agglutinieren. Die Agglutination wurde anhand von Trübheitsmessungen durch den Koagulations-Analyser bestimmt. Antigen-vWF wurde nachgewiesen durch ein kommerzielles ELISA-Kit (Asserachrom vWF antigenic, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) entsprechend der Hersteller-Anleitung.

Die HES-Konzentration wurde nach Extraktion aus dem Blutplasma und Hydrolyse zu Glucosemonomer-Einheiten quantifiziert (H. Förster et al., Infusionstherapie 1981; 2: 88-94). Die Plasma-Proben (1 ml) wurden bei 100 °C für 60 Minuten inkubiert, nachdem ihnen 0,5 ml KOH-Lösung 35 %ig (w/w) (Fluka, Buchs, Schweiz) zugege-

- 23 -

ben wurde. Die HES wurde durch Zugabe von 10 ml eiskaltem absoluten Ethanol (Fluka, Buchs, Schweiz) zum Überstand der Reaktionsmischung ausgefällt und anschließend durch Säurehydrolyse in 2 N HCl (Fluka, Buchs, Schweiz) für 60 Minuten bei 100 °C hydrolisiert. Die Glucosebestimmung erfolgte durch Einsatz eines Enzym-  
5 Testkits basierend auf Hexokinase/Glucose 6-phosphatase (Boehringer Mannheim, Darmstadt, Deutschland).

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte unter Annahme eines Zwei-Kompartiment-Modells mit konstanter Infusionsrate unter Verwendung der tatsächlichen Dosierungen und Infusionsdauern (WinNonlin, Version 4.1, Pharsight  
10 Corp, Mountainview, CA).

#### Statistische Analyse:

Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die beiden  
15 HES-Lösungen mit hohem Molekulargewicht (500 und 900 kD) wurden verglichen mit der niedrigmolekularen (130 kD) Lösung mittels des JMP 5.1 Statistikpakets (SAS Institute, Inc, Cary, NC). Die Wechselwirkung von Lösungs- und Zeiteffekten wurde mittels zweiseitiger ANOVA-Analyse und unter Berücksichtigung der Korrektur nach Bonferroni geprüft. Für die statistische Analyse der pharmakokinetischen Parameter  
20 wurde der t-Test für ungepaarte Daten nach Student verwendet. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

#### Anwendungsbeispiele

25 Für die nachstehend beschriebenen in vivo-Experimente wurden erfindungsgemäße Hydroxyethylstärken mit mittleren Molekulargewichten (Mw) von 500000 und 900000 Dalton und identischer molarer Substitution (MS = 0,42) und identischem C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnis (4.83) (nachfolgend in den Anwendungsbeispielen als HES 500/0,42 bzw. HES 900/0,42 bezeichnet) verwendet (siehe Herstellungsbeispiel für HES-  
30 Rohstoffe). Beide Hydroxyethylstärken (HES 900/0,42 und HES 500/0,42) wurden in 0,9 %iger Kochsalzlösung in einer Konzentration von 6 % aufgelöst, unter Verwen-



5 dung von 0,2 µm Filterkartuschen (Sartopore; Sartorius), sterilfiltriert, in Glasflaschen abgefüllt und 15 Minuten bei 121 °C hitzesterilisiert. Als Vergleichslösung diente eine niedermolekulare Hydroxyethylstärke (Mw = 130000 Dalton) mit identischem MS und C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>-Verhältnis (nachfolgend in den Anwendungsbeispielen als HES 130/0,42 bezeichnet), die ebenfalls in 6 %iger Konzentration in 0,9 % Kochsalzlösung vorlag. Wie beschrieben wurde sie aus dem gleichen Reaktionsansatz wie die erfindungsgemäßen hochmolekularen Stärken erhalten, von denen sie sich infolgedessen nur durch das Molekulargewicht unterschied.

10 *Untersuchung der Plasmaelimination und des Einflusses auf die Blutgerinnung*

30 Schweine wurden in 3 Kohorten zu jeweils 10 Tieren randomisiert. Die eine Kohorte erhielt eine intravenöse Infusion von HES 900/0,42, die andere eine Infusion von HES 500/0,42 und die dritte eine Infusion von HES 130/0,42 als Vergleich. In allen Fällen betrug die Dosis 20 ml/kg KG der jeweils 6 %igen HES-Lösungen, und  
15 die Infusion dauerte 30 Minuten. Für die Infusion und die nachfolgenden Blutentnahmen waren die Tiere anästhesiert (Halothan-Narkose) und kontrolliert beatmet. Blutentnahmen erfolgten vor Infusionsbeginn, nach 5, 20, 40, 60, 120 und 240 Minuten sowie 24 Stunden nach Infusionsende. In den Blut- bzw. den daraus gewonnenen Plasmaproben wurden bestimmt: Blut- und Plasmaviskosität, HES-Konzentration,  
20 Prothrombinzeit, partielle Thromboplastinzeit, von Willebrand Faktor, Faktor VIII und Ristocetin-Kofaktor sowie die üblichen thrombelastographischen Kenngrößen. Aus dem Verlauf der HES-Konzentrationen von Infusionsende bis 24 h danach wurden die Fläche unter der Konzentrationszeit-Kurve (= AUC von Area Under the Curve), die α- und β-Halbwertszeit sowie die Clearance berechnet. Die Berechnung der AUC  
25 erfolgte nach der log-linearen Trapezregel, und für die Berechnung der übrigen pharmakokinetischen Parameter wurde ein 2-Kompartiment-Modell zugrundegelegt. Aus diesem ergeben sich 2 Halbwertszeiten α und β, wobei die α-Halbwertszeit den Übertritt des HES vom zentralen Kompartiment (entspricht weitgehend dem Intravasalraum) in das periphere Kompartiment kennzeichnet und die β-Halbwertszeit die  
30 Rückverteilung in umgekehrter Richtung.

Der Verlauf der HES-Konzentration und die pharmakokinetischen Parameter ließen eine längere Plasmaverweildauer der hochmolekularen Varianten (HES 900/0,42 und HES 500/0,42) im Vergleich zu der niedermolekularen HES (HES 130/0,42) erkennen. So waren AUCs und die  $\alpha$ -Halbwertszeiten bei den hochmolekularen Varianten  
5 signifikant größer bzw. länger als bei der niedermolekularen Kontrolle; dementsprechend war die Clearance der hochmolekularen HES-Typen signifikant niedriger als die der niedermolekularen HES.

Überraschenderweise und völlig anders als bei bisher bekannten Typen von mittel-  
10 oder hochmolekularer HES (HES 200/0,5; HES 200/0,6; HES 450/0,7) bestand jedoch bei der Plasmakonzentration zum Zeitpunkt "24 Stunden nach Infusion" kein relevanter Unterschied zwischen den erfindungsgemäßen hochmolekularen Varianten und der niedermolekularen Vergleichslösung (vgl. Figur 1). Dies bedeutet, dass die erfindungsgemäßen hochmolekularen Hydroxyethylstärken in der für die Volumenwirksamkeit entscheidenden Phase unmittelbar nach der Infusion eine signifikant  
15 längere Plasmaverweildauer besitzen als die niedermolekulare Vergleichs-HES, dass sie aber anders als bisher bekannte hochmolekulare HES-Typen keine Neigung zur Kumulation im Kreislauf zeigen. Stattdessen waren die erfindungsgemäßen HES-Varianten 24 Stunden nach der Infusion ebenso wie die niedermolekulare Vergleichs-HES  
20 praktisch vollständig aus dem Kreislauf verschwunden.

Tabelle 4

<b>Lösung</b>	<b>HES 130/0,42</b>	<b>HES 500/0,42</b>	<b>HES 900/0,42</b>
AUC (g*min/l)	1156 ± 223	1542 ± 142**	1701 ± 321**
CL (ml/min)	39,1 ± 7,9	30,1 ± 5,4*	26,0 ± 4,1**
$t_{1/2\alpha}$ (min)	39,9 ± 10,7	53,8 ± 8,6*	57,1 ± 12,3*
$t_{1/2\beta}$ (min)	331,8 ± 100,0	380,6 ± 63,3	379,9 ± 75,8

Tab. 4: Fläche unter der Konzentration-Zeit-Kurve (AUC), Clearance (CL), alpha- und beta-Halbwertszeit ( $t_{1/2\alpha}$  und  $t_{1/2\beta}$ ) nach Infusion von jeweils 20 ml/kg 6 % HES 130/0,42, 6 % HES 500/0,42 bzw. 6 % HES 900/0,42 beim Schwein.

Die Signifikanzprüfung erfolgte zwischen HES 500 und HES 900 jeweils im Vergleich zu HES 130/0,42 mittels t-Test für ungepaarte Daten nach Student \*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

Die hochmolekularen HES-Spezies (HES 500/0,42 und HES 900/0,42) zeigten signifikant größere Flächen unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) entsprechend einer höheren Verweildauer im Intravasalraum, signifikant längere initiale Plasma-halbwertszeiten ( $t_{1/2\alpha}$ ) und signifikant niedrigere Clearanceraten als niedermolekulare (HES 130/0,42).

Figur 1 zeigt den Konzentrationsverlauf von niedermolekularer HES (HES 130/0,42) und hochmolekularer HES (HES 500/0,42 und HES 900/0,42) im Plasma nach Infusion von 20 ml/kg der jeweiligen HES-Lösung beim Schwein. HES 500/0,42 und HES 900/0,42 wurden anfangs langsamer aus dem Intravasalraum eliminiert als HES 130/0,42 (s.a. Tabelle 4: Pharmakokinetische Parameter); in der Endphase der Elimination, d.h. 24 h nach Infusionsende, bestand jedoch kein relevanter Unterschied zwischen den Plasmakonzentrationen mehr (die mittleren Konzentrationen lagen unter 0.2 g/l und damit im Bereich der Bestimmungsgrenze).

Es hat sich somit gezeigt, dass die erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärken einerseits eine längere initiale Plasmahalbwertszeit besitzen als zur Zeit bekannte niedermolekulare Referenzlösungen (HES 130/0,42), aber andererseits innerhalb von 24 Stunden nach der Infusion ebenso gut aus dem Kreislauf eliminiert werden können wie die zuletzt genannten, in dieser Hinsicht vorteilhaften niedermolekularen Vergleichspräparate.

Auch die vorgenommenen Gerinnungsanalysen (plasmatische Gerinnungstests, Thrombelastographie, Bestimmung der vWF-Konzentrationen) lieferten unerwartete, weil völlig andere Ergebnisse als sie mit hochmolekularen HES-Präparaten bisher erzielt werden konnten. Während bereits mittel- und in noch viel ausgeprägtem Maß hochmolekulare Hydroxyethylstärken bisher regelmäßig eine weitaus stärkere Beeinträchtigung der Blutgerinnung im Sinne einer Hypokoagulabilität erkennen ließen als niedermolekulare HES-Lösungen (J. Treib et al., Intensive Care Med. (1999), S. 258 bis 268; R.G. Strauss et al., Transfusion (1988), S. 257 – 260), zeigten sich zwischen den erfindungsgemäßen hochmolekularen HES-Präparaten und der bekannten niedermolekularen Vergleichslösung keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 5).



- 28 -

Tabelle 5

Para- meter	Lösung	vor Infusion	nach Infusion 5 min	nach Infusion 1 h	nach Infusion 2 h	nach Infusion 4 h	nach Infusion 24 h	p-Wert
PT (sec)	HES 130/0,42	8,57 ± 0,73	9,15 ± 0,66	9,00 ± 0,70	9,06 ± 0,67	8,77 ± 0,42	9,30 ± 0,64	-
	HES 500/0,42	9,32 ± 1,90	9,08 ± 0,49	8,97 ± 0,56	8,80 ± 0,33	8,57 ± 0,37	9,38 ± 0,58	0,533
	HES 900/0,42	8,59 ± 1,06	8,66 ± 0,51	8,56 ± 0,56	8,40 ± 0,27	8,21 ± 0,27	9,42 ± 0,51	0,068
aPTT (sec)	HES 130/0,42	12,19 ± 1,83	14,19 ± 4,21	13,68 ± 3,57	13,59 ± 1,57	13,11 ± 1,10	14,58 ± 3,01	-
	HES 500/0,42	11,97 ± 1,00	13,37 ± 1,12	12,65 ± 0,73	13,04 ± 1,31	13,17 ± 1,31	13,72 ± 1,40	0,893
	HES 900/0,42	11,94 ± 1,31	12,59 ± 1,16	13,10 ± 1,62	12,87 ± 1,06	12,78 ± 2,02	13,37 ± 1,50	0,706
CI	HES 130/0,42	4,53 ± 1,33	3,30 ± 0,91	4,18 ± 0,91	4,81 ± 0,63	4,48 ± 0,65	5,22 ± 0,35	-
	HES 500/0,42	5,04 ± 0,81	2,88 ± 1,28	4,47 ± 0,77	4,71 ± 0,65	4,18 ± 0,98	5,14 ± 0,79	0,303
	HES 900/0,42	5,35 ± 0,79	3,28 ± 1,18	4,47 ± 0,93	4,93 ± 0,82	4,68 ± 1,03	5,53 ± 0,55	0,468
vWF funkt.. (%)	HES 130/0,42	33,41 ± 10,18	30,09 ± 7,68	32,20 ± 8,63	33,59 ± 10,94	40,91 ± 10,48	28,80 ± 6,84	-
	HES 500/0,42	32,11 ± 4,85	25,38 ± 3,84	27,65 ± 4,32	30,80 ± 4,67	37,94 ± 4,65	23,04 ± 4,19	0,853
	HES 900/0,42	30,48 ± 3,95	24,78 ± 3,35	27,14 ± 4,14	31,41 ± 4,83	37,87 ± 8,06	24,84 ± 6,74	0,768
vWF antig.. (%)	HES 130/0,42	46,10 ± 8,45	35,80 ± 4,83	39,40 ± 8,42	40,10 ± 9,21	44,30 ± 6,80	38,22 ± 5,54	-
	HES 500/0,42	42,80 ± 4,13	37,90 ± 7,37	35,50 ± 4,22	37,60 ± 7,41	39,80 ± 10,65	38,00 ± 8,15	0,499
	HES 900/0,42	48,10 ± 19,56	33,30 ± 5,48	35,70 ± 5,89	37,80 ± 4,26	42,00 ± 4,85	41,67 ± 6,08	0,473

Tabelle 5 zeigt den Zeitverlauf der plasmatischen Gerinnungsparameter Prothrombinzeit (PT), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), funktionelle Aktivität des von Willebrand-Faktors (vWF funktionell) und antigenische Konzentration des von Willebrand-Faktors (vWF antigenisch) und Zeitverlauf des Koagulationsindex (CI) der Thrombelastographie nach Infusion von jeweils 20 ml/kg 6 % HES 130/0,42, 6 % HES 500/0,42 bzw. 6 % HES 900/0,42 beim Schwein. Die statistische Signifikanzprüfung (Interaktion von Lösungs- und Zeiteffekt) erfolgte zwischen HES 500/0,42 und HES 900/0,42 jeweils im Vergleich zu HES 130/0,42 mittels zweiseitiger ANOVA. Trotz höherer Molekulargewichte, höherer Konzentrationen sowie längerer Verweildauer im Plasma (vgl. Figur 1 und Tabelle 4) beeinflussten die erfindungsgemäßen hochmolekularen HES-Spezies (HES 500/0,42 und HES 900/0,42) die Blutgerinnung nicht mehr als niedermolekulare HES (HES 130/0,42).

Mit anderen Worten zeigten die erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärken trotz der durch Molekulargewichtserhöhung erreichten längeren Plasmaverweildauer nicht die Nachteile bekannter hochmolekularer HES-Lösungen, wie z.B. deren Beeinträchtigung der Blutgerinnung.

Überraschend zeigte sich zudem bei den tierexperimentellen Untersuchungen, dass die erfindungsgemäßen hochmolekularen Hydroxyethylstärken – anders als bekannte hochmolekulare Hydroxyethylstärken – die Blut- und Plasmaviskosität im Vergleich mit niedermolekularen HES nicht erhöhten. Bei niedrigen Scherkräften wurde unter den erfindungsgemäßen Hydroxyethylstärken sogar eine niedrigere Viskosität als unter der niedermolekularen HES gefunden (vgl. Tabelle 6: Plasmaviskosität).

Tabelle 6

Parameter	Lösung	vor Infusion	nach Infusion 5 min	nach Infusion 20 min	nach Infusion 40 min
Plasmavisk. $\gamma = 1/s$ (mPas)	HES 130/0,42	0,016383 ± 0,008241	0,012721 ± 0,005245	0,012620 ± 0,004280	0,012875 ± 0,003349
	HES 500/0,42	0,012313 ± 0,005196	0,012582 ± 0,001873	0,013591 ± 0,001912	0,012936 ± 0,002555
	HES 900/0,42	0,016869 ± 0,007240	0,012375 ± 0,002487	0,015985 ± 0,005659	0,015968 ± 0,006499
Plasmavisk. $\gamma = 128/s$ (mPas)	HES 130/0,42	0,001208 ± 0,000097	0,001327 ± 0,000644	0,001138 ± 0,000089	0,001167 ± 0,000105
	HES 500/0,42	0,001246 ± 0,000212	0,001110 ± 0,000045	0,001125 ± 0,000058	0,001106 ± 0,000037
	HES 900/0,42	0,001271 ± 0,000078	0,001141 ± 0,000064	0,001174 ± 0,000065	0,001166 ± 0,000075

Parameter	Lösung	nach Infusion 1 h	nach Infusion 2 h	nach Infusion 4 h	nach Infusion 24 h	p-Wert
Plasmavisk.	HES 130/0,42	0,014928 ± 0,003944	0,018318 ± 0,006364	0,015097 ± 0,007475	0,024577 ± 0,008847	-
$\gamma = 1/s$ (mPas)	HES 500/0,42	0,013070 ± 0,002860	0,011384 ± 0,005949	0,013736 ± 0,003974	0,015434 ± 0,004320	0,005
	HES 900/0,42	0,013678 ± 0,002252	0,014217 ± 0,003234	0,013557 ± 0,003713	0,015556 ± 0,004308	0,003
Plasmavisk.	HES 130/0,42	0,001142 ± 0,000084	0,001272 ± 0,000217	0,001232 ± 0,000136	0,001229 ± 0,000102	-
$\gamma = 128/s$ (mPas)	HES 500/0,42	0,001112 ± 0,000048	0,001206 ± 0,000114	0,001183 ± 0,000112	0,001257 ± 0,000068	0,386
	HES 900/0,42	0,001146 ± 0,000055	0,001304 ± 0,000224	0,001228 ± 0,000066	0,001247 ± 0,000104	0,444

Tabelle 6 zeigt den Zeitverlauf der Plasmaviskosität bei niedrigen und hohen Scherkräften ( $\gamma = 1/s$  und  $\gamma = 128/s$  nach Infusion von jeweils 20 ml/kg HES 130/0,42, 6 % HES 500/0,42 bzw. 6 % HES 900/0,42 beim Schwein. Die statistische Signifikanzprüfung (Interaktion von Lösungs- und Zeiteffekt) erfolgte zwischen HES 500/0,42 und HES 900/0,42 jeweils im Vergleich zu HES 130/0,42 mittels zweiseitiger ANOVA und ließ keine Unterschiede zwischen den hochmolekularen HES-Spezies (HES 900 und HES 500) und der niedermolekularen HES (HES 130) erkennen. Bei niedrigen Scherkräften erwies sich die Wechselwirkung von Lösungs- und Zeiteffekt bei der Plasmaviskosität unter den hochmolekularen HES-Spezies (HES 500/0,42 und HES 900/0,42) als niedriger im Vergleich zur niedermolekularen HES (HES 130/0,42). Dies war jedoch auf den Zeit- und nicht auf den Lösungseffekt zurückzuführen. Bei hohen Scherkräften bestand kein Unterschied: insbesondere war die Plasmaviskosität unter den hochmolekularen HES-Spezies (HES 900/0,42 und HES 500/0,42) nicht höher als unter niedermolekularer HES (HES 130/0,42).

Die Plasmaviskosität steigt unter den erfindungsgemäßen HES-Lösungen demnach nicht an. Dass kein Anstieg der Plasmaviskosität beobachtet wurde, ist insofern überraschend, da Hydroxyethylstärke mit einem vergleichbaren Molekulargewicht von 500000, wie in der US-A-5,502,043 offenbart (Vergleichsbeispiel 3) einen Anstieg der Plasmaviskosität aufgezeigt hat. Wenn die Viskosität nicht ansteigt, so führt dies zu einer ungestörten Kapillarperfusion (Mikrozirkulation) und einer verbesserten nutritiven Sauerstoffversorgung der Gewebe.

Neben den vorstehend beschriebenen in vivo-Untersuchungen wurden auch in vitro-Untersuchungen durchgeführt, bei denen speziell der Einfluss des  $C_2/C_6$ -Verhältnisses auf die Blutgerinnung geprüft wurde und zwar ebenfalls mit Hilfe der Thrombelastographie. Zu diesem Zweck wurden drei hochmolekulare HES-Lösungen (Mw: 800 kD) mit niedrigem MS (0.4) und niedrigem (3:1), mittlerem (7:1) bzw. hohem (12:1)  $C_2/C_6$ -Verhältnis hergestellt und folgendermaßen untersucht. Von 30 männlichen und weiblichen chirurgischen Patienten (Ausschlußkriterien: bekannte Gerinnungsstörungen, Behandlung mit Hemmstoffen der Blutgerinnung, Einnahme



von Acetylsalicylsäure oder anderen nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten innerhalb von 5 Tagen vor der Operation) wurde während der Anästhesieeinleitung eine Blutprobe entnommen. In jeder Blutprobe wurde die Gerinnung mittels Thrombelastographie gemessen und zwar im unverdünnten Blut und nach in vitro-Hämodilution (20 %, 40 % und 60 %) mit jeder der 3 HES-Lösungen (HES 800/0,4/3:1; HES 800/0,4/7:1 bzw. HES 800/0,4/12:1). Bestimmt wurde – wie schon bei den in vivo-Untersuchungen – der Coagulation Index (CI), der die einzelnen Partialfunktionen der Thrombelastographie zusammenfasst. Die Mittelwerte ( $\pm$  SD) der gefundenen CI-Werte sind in der nachfolgenden Tabelle 7 dargestellt und zwar als Abweichung vom CI in der jeweiligen unverdünnten Blutprobe.

Tabelle 7

	HES 800/0,4/3:1	HES 800/0,4/7:1	HES 800/0,4/12:1
20 % Hämodilution	- 2,32 (1,20)	- 2,86 (1,22)	- 3,35 (1,07)
40 % Hämodilution	- 5,91 (1,68)	- 6,17 (2,03)	- 6,50 (1,69)
60 % Hämodilution	- 9,71 (2,70)	- 10,37 (3,05)	- 10,55 (2,60)

Bei allen Hämodilutionsstufen wurde der CI in bezug auf den CI des Nativbluts umso weniger gesenkt, die Blutgerinnung also umso weniger beeinflusst, je niedriger das  $C_2/C_6$ -Verhältnis der zur Hämodilution verwendeten HES lag. Der Lösungseffekt zwischen den Hämodilutionsserien war signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ; ANOVA). Die Resultate zeigen, dass eine Erniedrigung des  $C_2/C_6$ -Verhältnisses von Hydroxyethylstärken günstig für deren Einfluss auf die Blutgerinnung ist und zwar in dem Sinn, dass die Blutgerinnung bei niedrigem  $C_2/C_6$ -Verhältnis weniger gehemmt wird als bei hohem. Dies ist insofern von Bedeutung, als HES-Lösungen unter anderem als Plasmaersatzmittel nach traumatisch oder operativ bedingten Blutungen eingesetzt werden und in dieser Situation den Blutverlust nicht durch eine Hemmung

der Blutgerinnung noch zusätzlich vergrößern dürfen. Die Ergebnisse der vorstehend beschriebenen Untersuchung zeigen weiterhin, dass vom dem  $C_2/C_6$ -Verhältnis von HES-Lösungen eine Eigenwirkung auf die Blutgerinnung ausgeht, die von anderen molekularen Parametern der HES und ihrem Verhalten im Kreislauf unabhängig ist.

5 Dies war bisher nicht bekannt.

Patentansprüche

1. Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht  $M_w$  größer oder gleich 500000, dadurch gekennzeichnet, dass der molare Substitutionsgrad MS zwischen 0,25 und 0,5 ist und das  $C_2/C_6$ -Verhältnis 2 bis unterhalb von 8 beträgt.  
5
2. Hydroxyethylstärke nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der molare Substitutionsgrad MS 0,35 bis 0,5, vorzugsweise 0,39 bis kleiner oder gleich 0,45, insbesondere größer 0,4 bis 0,44 ist.  
10
3. Hydroxyethylstärke nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass das mittlere Molekulargewicht oberhalb 600000 bis 1500000, vorzugsweise 620000 bis 1200000, besonders bevorzugt von 700000 bis 1000000 beträgt.  
15
4. Hydroxyethylstärke nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das  $C_2/C_6$ -Verhältnis 2 bis 7, vorzugsweise 2,5 bis kleiner oder gleich 7, besonders bevorzugt 2,5 bis 6 und insbesondere bevorzugt 4 bis 6 ist.  
20
5. Hydroxyethylstärke nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einer Wachsmaisstärke erhältlich ist.
- 25 6. Pharmazeutische Zubereitung umfassend eine Hydroxyethylstärke nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
7. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie als wässrige Lösung oder als kolloidale wässrige Lösung vorliegt.  
30

8. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxyethylstärke in einer Konzentration von bis zu 20 %, vorzugsweise 0,5 bis 15 %, besonders bevorzugt 2 bis 12 %, insbesondere 4 bis 10 %, beispielsweise 6 % vorliegt.
- 5
9. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich Natriumchlorid, vorzugsweise in 0,9 prozentiger Konzentration enthält.
- 10
10. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich plasmaadaptierte Elektrolyte aufweist.
11. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie als gepufferte Lösung und/oder als Lösung mit metabolisierbaren Anionen vorliegt.
- 15
12. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie als hypertone Lösung vorliegt.
13. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie sterilfiltriert oder hitzesterilisiert ist.
- 20
14. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Volumenersatzmittel ist.
- 25
15. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen pharmazeutischen Wirkstoff oder eine Wirkstoffkombination enthält.



16. Verwendung einer pharmazeutischen Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 15 zur Herstellung eines Plasmaersatzmittels oder eines Plasmaexpanders.
- 5 17. Verfahren zur Herstellung einer Hydroxyethylstärke, vorzugsweise wie in einem der Ansprüche 1 bis 5 definiert durch
- (i) Umsetzung von in Wasser suspendierter Stärke, vorzugsweise Maisstärke, mit Ethylenoxid und
- 10 (ii) anschließender Teilhydrolyse des erhaltenen Stärkederivats mit Säure, vorzugsweise Salzsäure bis zum gewünschten mittleren Molekulargewichtsbereich der Hydroxyethylstärke.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass der in Wasser suspendierten Stärke ein Alkalisierungsmittel, vorzugsweise NaOH, zugesetzt
- 15 wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass der suspendierten Stärke Alkalisierungsmittel in einer Menge zugesetzt wird, so dass das molare Verhältnis von Alkalisierungsmittel zu Stärke größer
- 20 0,2, vorzugsweise 0,25 bis 1, insbesondere 0,3 bis 0,8 ist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren zusätzlich die Schritte (iii) der Sterilisation und gegebenenfalls (iv) der Ultrafiltration umfasst.
- 25
21. Verwendung der pharmazeutischen Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 15 zur Aufrechterhaltung der Normovolämie und/oder zur Verbesserung der Makro- und Mikrozirkulation und/oder zur Verbesserung der nutritiven Sauerstoffversorgung und/oder zur Stabilisierung der Hämodynamik und/oder
- 30 zur Verbesserung der Volumenwirksamkeit und/oder zur Verringerung der Plasmaviskosität und/oder zur Erhöhung der Anämietoleranz und/oder zur

- 37 -

Hämodilution, insbesondere zur therapeutischen Hämodilution bei Durchblutungsstörungen und arteriellen, speziell peripheren arteriellen, Verschlusskrankheiten.

- 5      22. Kit umfassend in getrennter Form
- (i)      die Hydroxyethylstärke, wie in den Ansprüchen 1 bis 5 definiert,
  - (ii)     sterile Salzlösung, vorzugsweise sterile Natriumchlorid-Lösung und gegebenenfalls
  - (iii)    einen pharmazeutischen Wirkstoff oder eine Wirkstoffkombination.
- 10      23. Kit gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Einzelkomponenten (i), (ii) und gegebenenfalls (iii) in getrennten Kammern in einem Mehrkammerbeutel vorliegen.

15

FIG. 1

